

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-078478

(43)Date of publication of application : 19.03.2002

(51)Int.Cl.

G12N 1/00
 G12M 1/00
 C12M 1/04
 C12M 1/33
 C12P 13/04
 C12P 19/34
 C12P 21/00
 //(C12P 13/04
 C12R 1:645)
 (C12P 19/34
 C12R 1:645)
 (C12P 21/00
 C12R 1:645)

(21)Application number : 2000-269225

(71)Applicant : SHIMADZU CORP

(22)Date of filing : 05.09.2000

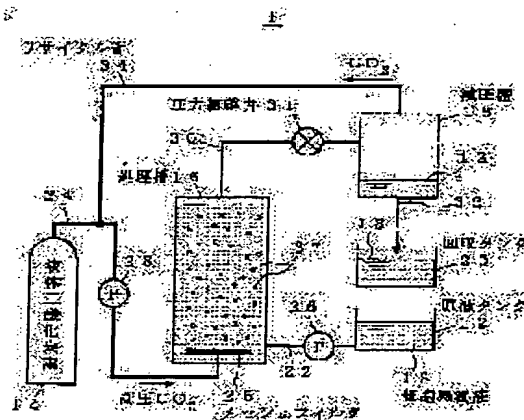
(72)Inventor : OSAJIMA YUTAKA
 SHIMODA MITSUYA
 MIYAKE MASAKI

(54) METHOD FOR TREATING CELL, APPARATUS FOR TREATING CELL AND SUBSTANCE TAKEN OUT FROM CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for treating cells, by which the membranes or walls of cells producing a target substance therein can efficiently be destructed to recover the target substance in a stable state, and to provide an apparatus therefor.

SOLUTION: Carbon dioxide of high pressure gas state (preferably, supercritical state or semi-critical state) is introduced into a cell suspension 13 in a treating tank 16 in a fine bubble state 27 having a diameter of $\leq 1,000 \mu\text{m}$ (preferably $\leq 200 \mu\text{m}$).



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-78478

(P2002-78478A)

(43) 公開日 平成14年3月19日 (2002.3.19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 1 2 N	1/00	C 1 2 N 1/00	N 4 B 0 2 9
C 1 2 M	1/00	C 1 2 M 1/00	Z 4 B 0 6 4
	1/04	1/04	4 B 0 6 5
	1/33	1/33	
C 1 2 P	13/04	C 1 2 P 13/04	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-269225(P2000-269225)

(22) 出願日 平成12年9月5日 (2000.9.5)

(71) 出願人 000001993

株式会社島津製作所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

(72) 発明者 篠島 豊

広島県庄原市三日市町20-17

(72) 発明者 下田 満哉

福岡県粕屋郡古賀町舞の里1丁目19-18

(72) 発明者 三宅 正起

京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会

社島津製作所内

(74) 代理人 100095670

弁理士 小林 良平

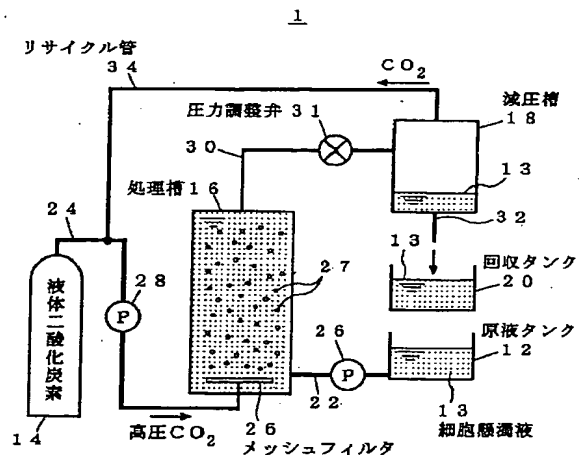
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞処理方法、細胞処理装置及び細胞から取り出された物質

(57) 【要約】

【課題】 目的物質を生産する細胞の細胞膜や細胞壁を効率よく破壊し、目的物質を安定な状態で効率よく回収できる細胞処理方法及びそのための装置を提供する。

【解決手段】 高压ガス状態（好ましくは、超臨界状態又は亜臨界状態）の二酸化炭素を直径1000 μm 以下（好ましくは200 μm 以下）の微小泡27にして処理槽16中の細胞懸濁液13に導入する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 目的物質を内包する微生物又は動植物細胞の懸濁液に高圧ガス状態の二酸化炭素を微小泡状にして導入する工程を備えることを特徴とする細胞処理方法。

【請求項2】 目的物質を内包する微生物又は動植物細胞の細胞膜又は細胞壁を破壊するための細胞処理装置において、高圧ガス状態の二酸化炭素を発生させる手段、及び前記二酸化炭素を微小泡状にして前記微生物又は動植物細胞の懸濁液に導入する手段を備えることを特徴とする細胞処理装置。

【請求項3】 請求項1の方法又は請求項2の装置により微生物又は動植物細胞から取り出された物質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、微生物や動植物の細胞内で生産された物質を細胞外に取り出す方法及びそのための装置に関する。

【0002】

【従来の技術】従来より、微生物や動植物の細胞の機能を利用して様々な有用物質（例えば、各種蛋白質、酵素、ビタミン、核酸）を量産するための技術が盛んに研究されている。このような技術の実用化に際しては、細胞膜や細胞壁を破壊し、細胞内で生産された目的物質を取り出す処理（以下、細胞破壊処理と呼ぶ）を効率よく行うことが必要である。

【0003】細胞破壊処理としては、（1）超音波処理、フレンチプレス、ヒュープレス、ホモジナイザー、ビーズミル等の機械的方法、（2）酸加水分解、アルカリ処理、塩や界面活性剤の添加等の化学的方法、（3）酵素処理、自己消化法等の生化学的方法、等が知られている。このうち機械的方法は、特別な処理物質を用いなく、比較的簡便であるという利点がある一方、摩擦や流体運動により熱が発生して処理対象物の温度が上昇すること、処理に時間がかかること、装置の大型化が困難であるため大量生産には適していないことといった問題がある。化学的方法及び生化学的方法は、細胞からの目的物質の抽出を選択的に行うことができるという利点がある一方、添加する薬剤や酵素が目的物質に不所望の影響を与えたり、細胞破壊処理後の試料から目的物質を分離させる処理が煩雑になるという問題がある。

【0004】特公平6-9502号公報には、菌体の培養液を、超臨界状態又は擬臨界状態の溶解溶剤と混合した後、圧力を瞬時に下げることを特徴とする菌体の粉碎方法が開示されている。この方法（以下、従来型臨界法と呼ぶ）では、超臨界状態又は擬臨界状態の溶解溶剤（例えば、炭酸ガス、炭素数2～4の炭化水素及びこれ

らの混合物）を溶解溶剤と混合することにより細胞膜内にその溶解溶剤を拡散させた後、急激に圧力を下げる。すると、細胞膜内に拡散した高密度の溶解溶剤が急激に膨張し、この膨張力に細胞膜は抗しきれず粉々に破壊されるものである。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】上記従来型臨界法では、培養液中に水分が存在するとその水分が溶解溶剤の拡散抵抗を増大させる。このため、好ましくは遠心分離器等により前もって培養液から水分を可能な限り除去するべきであるとされている（上記公報第2頁右欄第6～9行目）。このような水分除去工程が必要であることは、細胞破壊処理の効率化を妨げる一つの要因となっている。本発明はこのような課題を解決するために成されたものであり、その目的とするところは、目的物質を生産する細胞の細胞膜や細胞壁を効率よく破壊し、目的物質を安定な状態で効率よく回収できる細胞処理方法及びそのための装置を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するために成された本発明に係る細胞処理方法は、目的物質を内包する微生物又は動植物細胞の懸濁液に高圧ガス状態の二酸化炭素を微小泡状にして導入する工程を備えることを特徴としている。

【0007】また、本発明に係る細胞処理装置は、目的物質を内包する微生物又は動植物細胞の細胞膜又は細胞壁を破壊するための細胞処理装置において、高圧ガス状態の二酸化炭素を発生させる手段、及び前記二酸化炭素を微小泡状にして前記微生物又は動植物細胞の懸濁液に導入する手段を備えることを特徴としている。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明に係る方法では、微生物又は動植物細胞の懸濁液に高圧ガス状態の二酸化炭素を接触させるに際して、その二酸化炭素を微小泡状にして懸濁液に導入するようにしている。高圧ガス状態の二酸化炭素とは、圧力1MPa以上の二酸化炭素をいい、好ましくは超臨界状態（温度31.1℃以上、圧力7.38MPa以上。図3の相平衡図参照）又は亜臨界状態（温度25℃以上、圧力5MPa以上）の二酸化炭素である。また、微小泡とは径が1000μm以下、好ましくは200μm以下の泡である。このような本発明に係る方法によれば、たとえ微生物又は動植物細胞の懸濁液が希薄なもの（水分を多く含むもの）であっても、二酸化炭素は懸濁液に効率よく溶解する。懸濁液に溶解した二酸化炭素は、細胞膜や細胞壁を構成する脂質二重膜に浸透し、それを破壊する。このとき、処理に関する諸条件（温度、圧力、懸濁液の量（バッチ処理の場合）又は供給流量（連続処理の場合）、二酸化炭素の量（バッチ処理の場合）又は供給流量（連続処理の場合）、処理時間、処理液のpH等）を適切に設定しておくことによ

り、細胞内に含まれる目的物質に影響を与えることなく細胞膜や細胞壁だけを破壊することができる。

【0009】本発明に係る方法において、二酸化炭素を溶解させた懸濁液を急激に減圧する工程を更に設けるようにすれば、減圧に伴う二酸化炭素の膨張によって確実に細胞膜や細胞壁が破壊される。また、減圧の結果、二酸化炭素は気体となるため、懸濁液から容易にこれを分離することができる。

【0010】本発明に係る細胞処理方法は、高圧ガス状態の二酸化炭素を発生させる手段及び前記二酸化炭素を微小泡状にして前記微生物又は動植物細胞の懸濁液に導入する手段を備える本発明に係る細胞処理装置を用いて実施することができる。

【0011】図1は本発明に係る細胞処理装置の一形態である連続式細胞処理装置の概略構成図である。この装置1は、原液タンク12、ポンベ14、処理槽16、減圧槽18及び回収タンク20を備えている。原液タンク12には細胞懸濁液13が貯留されており、ポンベ14には液体二酸化炭素が封入されている。原液タンク12及びポンベ14はそれぞれ原液供給管22及び二酸化炭素供給管24によって処理槽16の底部と接続されている。原液供給管22及び二酸化炭素供給管24の途上にはそれぞれポンプ26及び28が配設されている。処理槽16の上部は液配送管30により減圧槽18と接続されている。減圧槽18の底部には液体取出口32が設けられており、その下に回収タンク20が配置されている。減圧槽18の上部にはリサイクル管34の一端が接続されている。リサイクル管34の他端は二酸化炭素供給管24に接続されている。

【0012】上記細胞処理装置1の作用は以下の通りである。まず、ポンプ26及び28を起動し、原液タンク12及びポンベ14から細胞懸濁液13及び高圧二酸化炭素（好ましくは超臨界状態又は亜臨界状態の二酸化炭素）を処理槽16の底部に送り込む。処理槽16の底部にはメッシュフィルタ26が二酸化炭素供給管24の出口に配設されており、高圧二酸化炭素はこのメッシュフィルタ26を通過する際に直径数100 μ m以下の微小泡27となる。こうして微小泡化されて細胞懸濁液13に放出された高圧二酸化炭素は、細胞懸濁液13中に浮遊する細胞の細胞膜又は細胞壁を構成する脂質二重膜に浸透し、その一部を破壊する。

【0013】上記のように高圧二酸化炭素の溶解した細胞懸濁液13は処理槽16内を上へ向かって流れて処理槽16の上部に到達し、液配送管30に流入する。液配送管30には圧力調整弁31が配設されており、液配送管30を流れる細胞懸濁液13の圧力は圧力調整弁31を通過する際に急激に低下する。このとき、細胞膜又は細胞壁に浸透した二酸化炭素が急激に膨張し、気化する。これにより細胞膜又は細胞壁は確実に破壊される。

液配送管30を流れる細胞懸濁液13は減圧槽18に入り、ここで二酸化炭素ガスが細胞懸濁液13から分離される。細胞懸濁液13は液体取出口32から流下し、回収タンク20に貯まる。一方、二酸化炭素ガスはリサイクル管34を通じて二酸化炭素供給管24に戻り、再利用される。

【0014】なお、図1の装置は連続式細胞処理装置であるが、処理槽16をバッチ処理用のものに置き換えることにより、バッチ式細胞処理装置を構成することも可能である。

【0015】

【実施例】本発明の方法の効果を確認するため、次のような実験を行った。

【0016】（実験1）標準栄養培地を用いて常法により培養した酵母を菌体重量基準で1.0%となるように生理食塩水で調整した酵母懸濁液と、メッシュ径10 μ mのマイクロフィルタで微小泡化した高圧二酸化炭素とを処理槽16に連続的に導入した。実験は二酸化炭素圧力の異なる3試験区で行った。処理条件は以下の通りである。

処理温度：35 $^{\circ}$ C

懸濁液供給速度：20kg/時間

二酸化炭素供給速度：4kg/時間

二酸化炭素圧力：10MPa、20MPa、30MPa（3試験区）

平均滞留時間：15分

【0017】上記処理の後、細胞内から懸濁液中に溶出した目的物質の量を測定した。目的物質は、アミノ酸、蛋白質、核酸の3つであり、アミノ酸はニンヒドリン法、蛋白質はLOWRY法、核酸は紫外線吸収法によりそれぞれ懸濁液中の濃度を求め、それに基づいて各目的物質の菌体重量当たりの溶出量を算出した。

【0018】（実験2）従来型臨界法についても上記と同様の処理条件で実験を行った。

【0019】（実験3）対照区として、上記酵母懸濁液に対して30秒間の超音波処理と2分間の冷却処理を交互に30回繰り返すことにより細胞の完全破壊を行い、細胞内からの各目的物質の溶出量を測定した。この溶出量は、細胞内の各目的物質の総量とみなされる。

【0020】以上の実験結果を図2に示す。図2の表では、実験3（超音波法）での各目的物質の溶出量を100として実験1及び実験2の各試験区での溶出量を収率（%）で表している。なお、この表では本発明に係る方法をマイクロバブル法と表記している。この結果から分かるように、本発明に係る方法によれば、従来型臨界法よりもはるかに高い収率で目的物質を回収することができる。

【0021】

【発明の効果】化学的又は生化学的方法と比較すると、本発明による方法は二酸化炭素のみを用いるものである

ため低コストであるだけでなく、薬剤や酵素等の特殊物質が目的物質に不所望の影響を与える恐れもない。また、本発明の方法では、上記のような減圧処理により二酸化炭素は容易に懸濁液から分離できるため、細胞破壊処理後の懸濁液から目的物質を分離させる処理も容易であり、また、たとえ処理後の懸濁液中に二酸化炭素が残留しても、それが人体に害を与える恐れはない。

【0022】機械的方法と比較すると、本発明による処理は常温域又はそれ以下の温度で行われるため、熱による目的物質の変質のおそれがない。更にまた、本発明に係る方法では、連続処理用のラインを構成することも容易であるため、量産用設備への応用に適している。

【0023】従来型臨界法と比較すると、本発明による方法は、水分を含有する懸濁液にも効率よく十分に二酸化炭素を溶解させることができるため、処理対象となる試料形態の範囲が広い。また、実施例に示したように、本発明による方法によれば、従来型臨界法によるよりもはるかに効率よく目的物質を回収することができる。

【0024】なお、二酸化炭素以外のガス、例えば窒素ガスを用いて細胞処理を行う場合も、本発明に従ってその窒素ガスを微小泡化して細胞懸濁液に導入するように*

*すれば、窒素ガスの溶解効率が高まり、目的物質の収率が高くなることが期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明に係る細胞処理装置の一形態である連続式細胞処理装置の概略構成図。

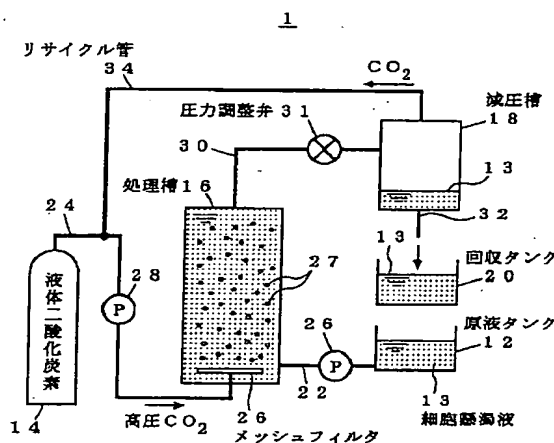
【図2】 本発明の効果を調べた実験の結果を示す表。

【図3】 温度、圧力と物質の超臨界状態との関係を示す相平衡図。

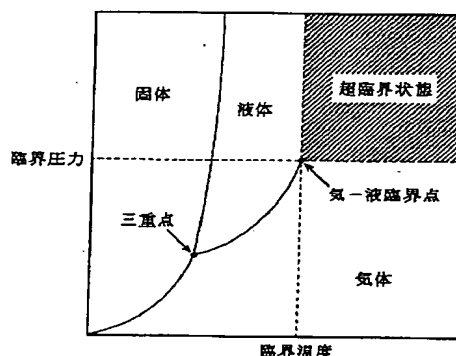
【符号の説明】

- 10 連続式細胞処理装置
- 12 原液タンク
- 13 細胞懸濁液
- 14 ポンプ
- 16 処理槽
- 18 減圧槽
- 20 回収タンク
- 24 二酸化炭素供給管
- 26 メッシュフィルタ
- 27 微小泡
- 31 圧力調整弁

【図1】



【図3】



【図2】

処理方法	圧力 (MPa)	アミノ酸溶出量 (%)	蛋白質溶出量 (%)	核酸溶出量 (%)
超音波法	—	100	100	100
マイクロバブル法	1.0	81	49	47
従来型臨界法	1.0	48	22	16
マイクロバブル法	2.0	90	82	77
従来型臨界法	2.0	53	27	20
マイクロバブル法	3.0	94	86	88
従来型臨界法	3.0	60	33	35

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	ターマコード (参考)
C 1 2 P	19/34	C 1 2 P	19/34
	21/00		21/00
/(C 1 2 P	13/04	(C 1 2 P	13/04
C 1 2 R	1:645)	C 1 2 R	1:645)
(C 1 2 P	19/34	(C 1 2 P	19/34
C 1 2 R	1:645)	C 1 2 R	1:645)
(C 1 2 P	21/00	(C 1 2 P	21/00
C 1 2 R	1:645)	C 1 2 R	1:645)

F ターム (参考) 4B029 AA15 AA27 BB01 CC01
 4B064 AE03 AF27 AG01 CA01 CA10
 CA11 CC30
 4B065 AA01X AA88X AA90X BD04
 BD50 CA17 CA23 CA24